

日本国特許庁 PCT/JP00/07992

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

13.11.00 付

09/889379

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

1999年11月16日

REC'D 03 JAN 2001  
WIPO PCT

出願番号  
Application Number:

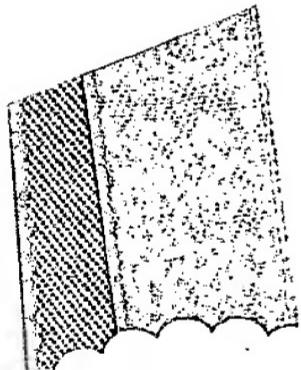
平成11年特許願第326007号

JP00/7992

出願人  
Applicant(s):

科学技術振興事業団

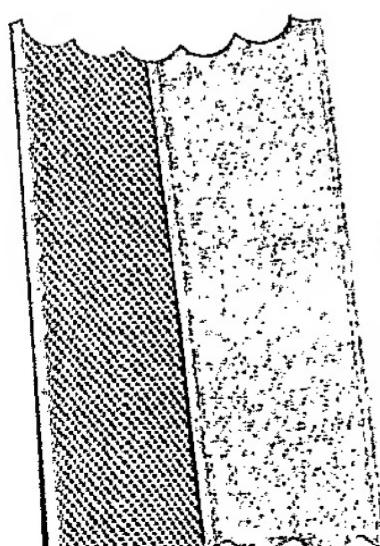
EU



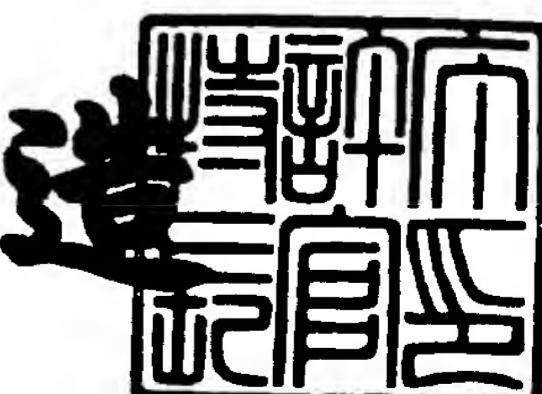
PRIORITY  
DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年12月15日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office



及川耕造



出証番号 出証特2000-3103563

【書類名】 特許願  
 【整理番号】 PA902087  
 【提出日】 平成11年11月16日  
 【あて先】 特許庁長官 殿  
 【発明者】  
   【住所又は居所】 東京都新宿区市谷砂土原町3-17-1-1-303  
   【氏名】 杉山 弘  
 【発明者】  
   【住所又は居所】 京都府京都市山科区勧修寺柴山1-21  
   【氏名】 齋藤 烈  
 【発明者】  
   【住所又は居所】 東京都文京区小石川5-31-5 ビラしんび303  
   【氏名】 飯田 博一  
 【特許出願人】  
   【識別番号】 396020800  
   【氏名又は名称】 科学技術振興事業団  
   【代表者】 理事長 中村 守孝  
 【代理人】  
   【識別番号】 100102668  
 【弁理士】  
   【氏名又は名称】 佐伯 憲生  
   【電話番号】 03-5205-2521  
 【手数料の表示】  
   【予納台帳番号】 039251  
   【納付金額】 21,000円  
 【提出物件の目録】  
   【物件名】 明細書 1  
   【物件名】 図面 1  
   【物件名】 要約書 1

特平11-326007

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 生理活性をもつピロールイミダゾール誘導体のスクリーニング法の開発

【特許請求の範囲】

【請求項1】 一般式(I)

B-L-A (I)

(式中、BはDNAの塩基配列を認識することができる非天然型の塩基を含有する化学構造を示し、AはDNAとの相互作用を有する化学構造を示し、LはA及びBの化学構造を結合させ得るリンカーを示す。)

で表されるDNAの塩基配列を認識し得る化学種を用いて、DNA又はRNAを含有する物質に対する化学種Aの作用を検出または同定する方法。

【請求項2】 多数のウェルを有するプレート中の各ウェルにDNA又はRNAの塩基配列を認識することができる一般式(I)で表される化合物を存在させ、当該プレートの各ウェルにDNA又はRNAを含有する物質を導入し、一般式(I)で表される化合物とDNA又はRNAを含有する物質とを充分に作用させた後、DNA又はRNAを含有する物質の状態を測定することからなるDNA又はRNAを含有する物質に対する化学種Aの作用を検出または同定する請求項1に記載の方法。

【請求項3】 各ウェルに存在させる一般式(I)で表される化合物が、DNA又はRNAを含有する物質のDNA又はRNAの異なる塩基配列を認識することができるものであり、各ウェルに導入されるDNA又はRNAを含有する物質が同じ物質である請求項2に記載の方法。

【請求項4】 各ウェルに存在させる一般式(I)で表される化合物が、DNA又はRNAを含有する物質のDNA又はRNAの特定の1種類の塩基配列を認識することができるものであり、各ウェルに導入されるDNA又はRNAを含有する物質が異なる物質である請求項2に記載の方法。

【請求項5】 ウェルに一般式(I)で表される化合物が固定化されている請求項1～4のいずれかに記載の方法。

【請求項6】 DNA又はRNAの塩基配列を認識することができる非天然

型の塩基を含有する化学構造が、DNA又はRNAを含有する物質の天然のDNA又はRNAの連続する少なくとも2塩基を認識するものである請求項1～5のいずれかに記載の方法。

【請求項7】 DNAの塩基配列を認識することができる非天然型の塩基を含有する化学構造が、置換基を有してもよいピロール及び／又はイミダゾールから誘導される化学構造である請求項1～6のいずれかに記載の方法。

【請求項8】 置換基を有してもよいピロール及び／又はイミダゾールから誘導される化学構造が、主鎖上又は主鎖に懸垂されている請求項7に記載の方法。

【請求項9】 DNAとの相互作用を有する化学構造を有するAが、抗癌剤の化学構造である請求項1～8のいずれかに記載の方法。

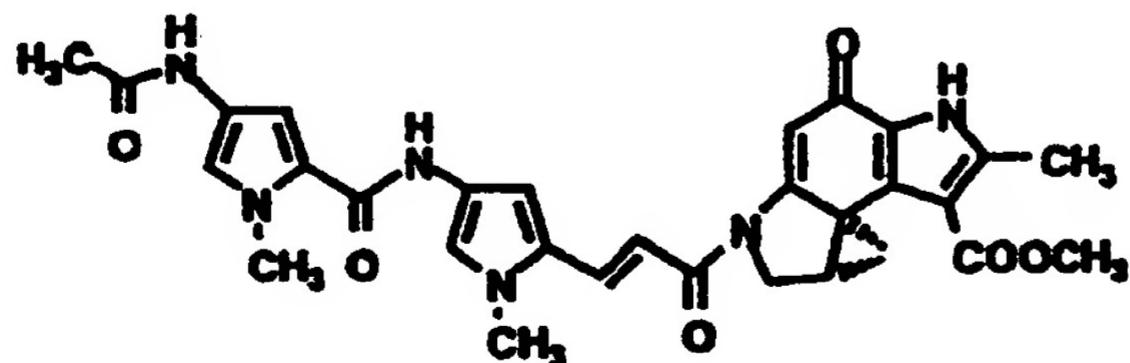
【請求項10】 抗癌剤が、アルキル化剤である請求項9に記載の方法。

【請求項11】 アルキル化剤が、シクロプロパン環を有する化学構造である請求項10に記載の方法。

【請求項12】 A及びBの化学構造を結合させ得るリンカーが、ビニル基を含有する化学構造である請求項1～11のいずれかに記載の方法。

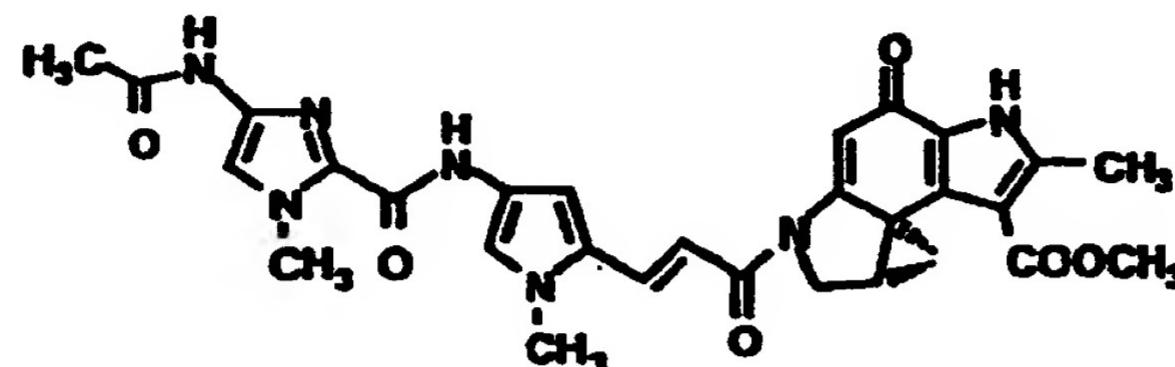
【請求項13】 一般式(I)で表される化合物が次式

【化1】



又は

【化2】



で表される化合物である請求項7～12のいずれかに記載の方法。

【請求項14】 DNA又はRNAを含有する物質が、細胞である請求項1～13のいずれかに記載の方法。

【請求項15】 細胞が、癌細胞である請求項14に記載の方法。

【請求項16】 DNA又はRNAを含有する物質の状態を測定する手段が、物質の生死を判定する方法である請求項2～15のいずれかに記載の方法。

【請求項17】 物質の生死を判定する方法が、物質の着色によるものである請求項16に記載の方法。

【請求項18】 請求項1～17のいずれかに記載の方法を行うための、DNA又はRNAを含有する物質に対する化学種Aの作用を検出または同定用のキット。

【請求項19】 一般式(I)

B-L-A (I)

(式中、BはDNAの塩基配列を認識することができる非天然型の塩基を含有する化学構造を示し、AはDNAとの相互作用を有する化学構造を示し、LはA及びBの化学構造を結合させ得るリンカーを示す。)

で表されるDNAの塩基配列を認識し得る化学種、及び作用後のDNA又はRNAを含有する物質の状態を測定する手段のための器具又は試薬からなる請求項18に記載のキット。

【請求項20】 複数のウェルを有するプレート中の各ウェルに、一般式(

I)、

B-L-A (I)

(式中、BはDNAの塩基配列を認識することができる非天然型の塩基を含有する化学構造を示し、AはDNAとの相互作用を有する化学構造を示し、LはA及びBの化学構造を結合させ得るリンカーを示す。)

で表されるDNAの塩基配列を認識し得る化学種が存在してなる複数のウェルを有するプレート。

**【請求項21】** DNA又はRNAを含有する物質に対する化学種Aの作用を検出または同定するためのプレートである請求項20に記載のプレート。

**【発明の詳細な説明】**

**【0001】**

**【発明の属する技術分野】**

本発明は、天然のDNA又はRNAの塩基配列を認識することができる非天然型の塩基を含有する化学構造を有する化学種を用いて、細胞などのDNA又はRNAを含有する物質に対する作用を検出または同定する方法、そのためのキット、及びそれにもちいるプレートに関する。

**【0002】**

**【従来の技術】**

ヒトゲノムプロジェクトにより我々の「生命の設計図」である全遺伝子の塩基配列が数年内に解明されようとしている。この設計図に傷があったり、後天的に傷がはいると、病気や老化を引き起こすことが知られている。ヒトゲノムプロジェクトの進展により癌を含む多くの疾病はDNAレベルで理解されるようになり、診断、予防などを中心とした医学全体が、革命的に変化するものと考えられる。さらに、これらの疾病のDNAレベルでの理解に基づいた治療法、すなわち病因遺伝子やその産物をターゲットとした医薬品の開発への期待も大きいが、基礎研究を臨床研究に生かしてゆくための橋渡し的な研究は、まだ途についたばかりである。現在、用いられている抗癌剤は、スクリーニングによって選択された生物質が多く、もともと癌細胞を殺すために微生物が產生したものではなく、癌の分子生物学的知見に基づいたものはほとんどない。細胞内の特定遺伝子の発現

を細胞外から自由自在にコントロールすることが可能になれば、究極の遺伝子レベルでの治療法となると考えられる。

#### 【0003】

本発明者らは、最近抗生物質デュオカルマイシンがディスタマイシンなどの他種分子とヘテロダイマーを形成し協同的にDNAの分子認識を行ない、デュオカルマイシン単独の場合とは異なる塩基配列を効率よくアルキル化することを発見した(Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93,14405,1996)。この結果をもとにデュオカルマイシンのアルキル化部分にDNA認識部位としてピロールーイミダゾールポリアミドを結合させ、任意の塩基配列でDNAを選択的にアルキル化する分子の合成に成功し、特許出願をした(特願平10-260710号)。

#### 【0004】

しかし、デュオカルマイシンのアルキル化部分にDNA認識部位としてピロールーイミダゾールポリアミドを結合させだけの化合物ではアルキル化能が十分なだけではなく、これらの化合物は1本鎖の塩基配列しか認識できないものであった。そこで、本発明者らは、これらの化合物の分子動力学などのコンピュータモデリングを用いてこれらの分子とDNAとのアルキル化を詳細に検討し、デュオカルマイシンの反応性のあるシクロプロパン部分(セグメントA)にビニル基などのリンカーを導入することにより、2本鎖DNAを同時にアルキル化し切断することを見出した(特願平11-83591号)。

#### 【0005】

これらの天然のDNAやRNAの塩基配列を認識する人工の化学種は、天然のDNAやRNAの特定の塩基配列に認識して当該特定の位置においてセグメントAの作用をDNAやRNAに及ぼすものであることから、天然のDNAやRNAの部分配列に代えてこれらの人工の化学種を応用することができることを見出された。

#### 【0006】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、これらの人工の化学種を用いて細胞などのDNA又はRNAを含有する物質に対するセグメントA(化学種A)の作用をスクリーニングする方法を

提供するものである。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明は、一般式（I）



（式中、BはDNAの塩基配列を認識することができる非天然型の塩基を含有する化学構造を示し、AはDNAとの相互作用を有する化学構造を示し、LはA及びBの化学構造を結合させ得るリンカーを示す。）

で表されるDNAの塩基配列を認識し得る化学種を用いて、DNA又はRNAを含有する物質に対する化学種Aの作用を検出または同定する方法に関する。

【0008】

より詳細には、本発明は、多数のウェルを有するプレート中の各ウェルにDNA又はRNAの塩基配列を認識することができる一般式（I）で表される化合物を存在させ、当該プレートの各ウェルにDNA又はRNAを含有する物質を導入し、一般式（I）で表される化合物とDNA又はRNAを含有する物質とを充分に作用させた後、DNA又はRNAを含有する物質の状態を測定することからなるDNA又はRNAを含有する物質に対する化学種Aの作用を検出または同定する方法に関する。

【0009】

さらに詳細には、本発明は、前記の方法において、各ウェルに存在させる一般式（I）で表される化合物が、DNA又はRNAを含有する物質のDNA又はRNAの異なる塩基配列を認識することができるものであり、各ウェルに導入されるDNA又はRNAを含有する物質が同じ物質である前記した方法に関する。

また、本発明は、前記した方法において、各ウェルに存在させる一般式（I）で表される化合物が、DNA又はRNAを含有する物質のDNA又はRNAの特定の1種類の塩基配列を認識することができるものであり、各ウェルに導入されるDNA又はRNAを含有する物質が異なる物質である前記した方法に関する。

【0010】

また、本発明は、前記した各種の方法を行うための、DNA又はRNAを含有す

る物質に対する化学種Aの作用を検出または同定用のキットに関する。

より詳細には、本発明は、一般式（I）



（式中、BはDNAの塩基配列を認識することができる非天然型の塩基を含有する化学構造を示し、AはDNAとの相互作用を有する化学構造を示し、LはA及びBの化学構造を結合させ得るリンカーを示す。）

で表されるDNAの塩基配列を認識し得る化学種、及び作用後のDNA又はRNAを含有する物質の状態を測定する手段のための器具又は試薬からなる、DNA又はRNAを含有する物質に対する化学種Aの作用を検出または同定するためのキットに関する。

#### 【0011】

さらに、本発明は、複数のウェルを有するプレート中の各ウェルに、一般式（I）、



（式中、BはDNAの塩基配列を認識することができる非天然型の塩基を含有する化学構造を示し、AはDNAとの相互作用を有する化学構造を示し、LはA及びBの化学構造を結合させ得るリンカーを示す。）

で表されるDNAの塩基配列を認識し得る化学種が存在してなる複数のウェルを有するプレートに関し、当該プレートがDNA又はRNAを含有する物質に対する化学種Aの作用を検出または同定するためのものであるプレートに関する。

#### 【0012】

本発明の前記一般式（I）における、DNAの塩基配列を認識することができる非天然型の塩基を含有する化学構造であるBは、置換基を有してもよいピロール及び／又はイミダゾールから誘導される化学構造が好ましい。ピロールやイミダゾールの置換基としては、DNAの塩基配列を認識する妨げとならないものであれば特に制限はなく、例えば、炭素数1～10、好ましくは1～5の直鎖又は分枝状のアルキル基、前記したアルキル基から誘導されるアルコキシ基、水酸基、アミノ基、前記したアルキル基から誘導されるN-アルキル置換アミノ基、有機カルボン酸から誘導されるN-アシリルアミノ基、グアニジノ基、置換グアニジ

ノ基などが挙げられる。例えば、N-メチルピロール、N-メチルイミダゾール、3-ヒドロキシピロール、N-メチル-3-ヒドロキシピロールなどが挙げられる。

#### 【0013】

これらの天然の塩基配列を認識し得る非天然型の塩基は、主鎖上又は主鎖に懸垂させていてもよい。これらの非天然型の塩基が主鎖上に存在する場合には、これらの非天然型の塩基自体が主鎖を形成するための官能基を有しており、例えば非天然型の塩基の一端にカルボキシル基を有し、他端にアミノ基を有し、これらがポリアミド構造を形成するようにすればよい。主鎖を形成する構造は、前記ポリアミド構造に限定されるものではなく、ポリエステル構造やポリイミン構造などの重合体を形成し得るものであってもよい。

また、主鎖に懸垂される場合には、天然のDNAやRNAのように多糖類の構造に懸垂させていてもよいし、合成の重合体の構造に懸垂させていてもよい。

好ましいDNAの塩基配列を認識することができる非天然型の塩基を含有する化学構造であるBとしては、より具体的にはピロール-イミダゾールポリアミド結合が好ましい。ピロールやイミダゾールの長さ（個数）は特に制限はないが、好ましくは2～30個、より好ましくは24～16個、さらに好ましくは4～16個程度である。

#### 【0014】

DNAの塩基の一種に結合し得る化学構造部分であるAとしては、DNAやRNAと相互作用をするものであれば種々の化学種を使用することができる。好ましい化学種A（セグメントA）の構造としては、抗癌作用を有する化学物質の構造が挙げられる。抗癌作用を有する化学物質としては、DNAに作用するアルキル化剤が好ましい。より好ましくは、シクロプロパン環を有する化学構造が挙げられ、デュオカルマイシンのアルキル化部分がより好ましい。

A及びBの化学構造を結合させ得るリンカー部分Lとしては、セグメントAとセグメントBとを適当な距離で隔てることができ、かつ、アルキル化活性を失活させないものが好ましい。好ましい具体例としてはビニル基を含有する化学構造が挙げられる。

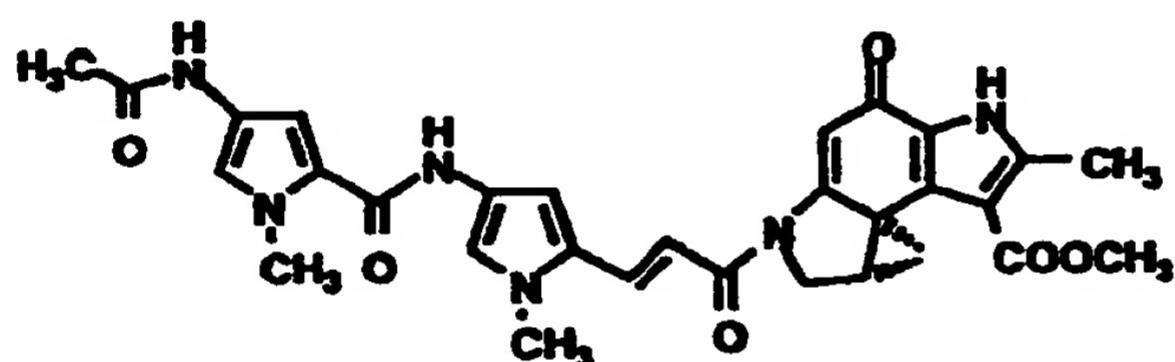
## 【0015】

これらの一般式(I)で表される化合物はこれを単独で使用することもできるが、これらの2種以上を混合して使用することもできる。2種以上の一般式(I)であらわされる化合物を混合して使用する場合には、種々の混合パターンがあるが、一般的には化学種B(セグメントB)の異なる化学種を混合するのが好ましいが、これに限定されるものではない。

一般式(I)で表される本発明の化合物の好ましいものとしては、次式

## 【0016】

## 【化3】

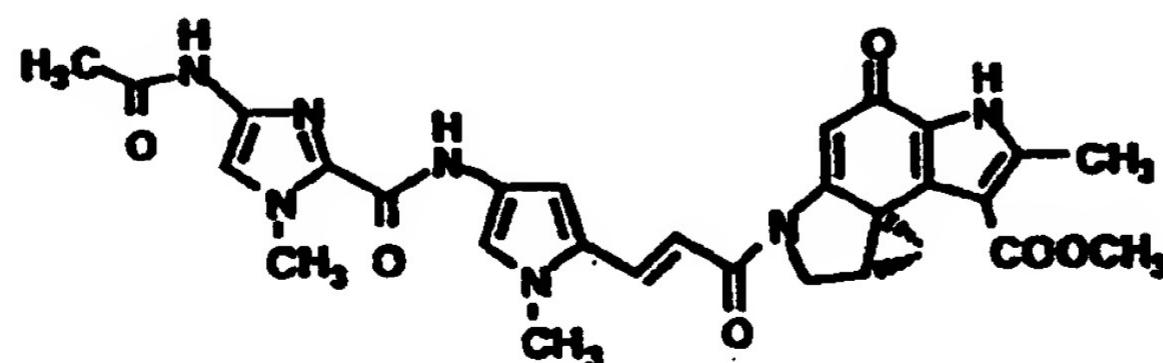


## 【0017】

で表される化合物(以下、「PyPyLDu86」という。)、又は

## 【0018】

## 【化4】



## 【0019】

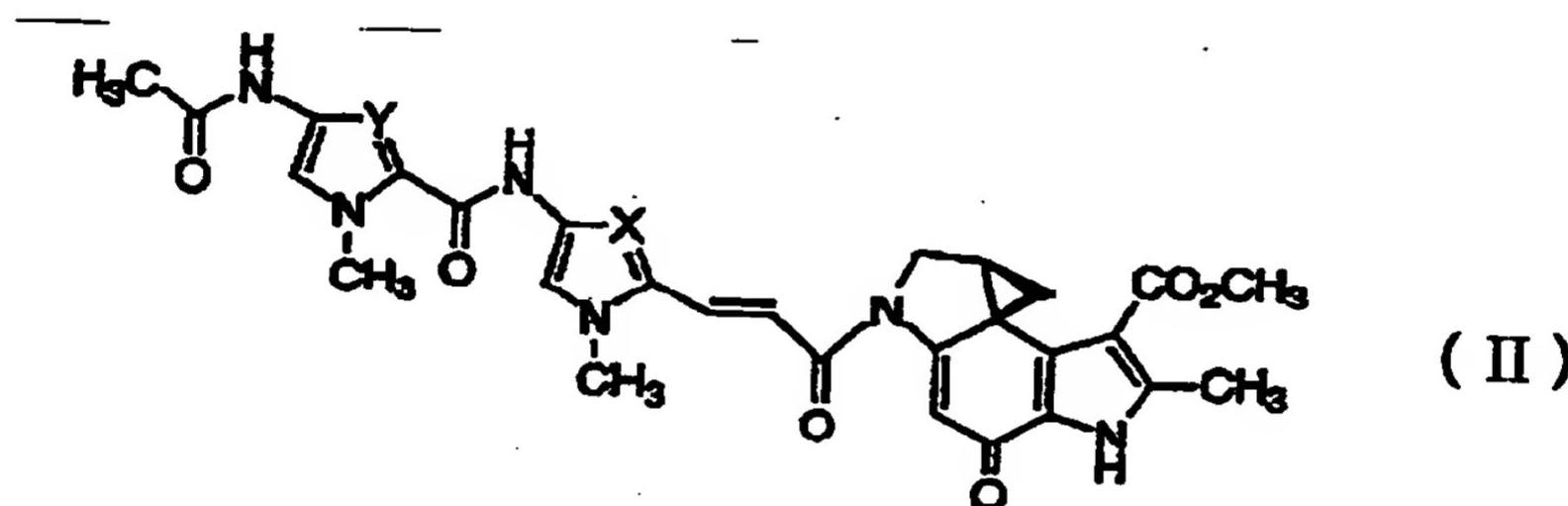
で表される化合物（以下、「ImPyLDU86」という。）が挙げられる。

前記した化合物は、塩基配列TGACGをはじめとするImPyLDU86に  
対応する配列群、又はそれらの相補鎖を認識する。

さらに、次式のPyPyLDU86を基本構造とする{Py又はIm}{Py  
又はIm}LDU86の構造を有する一般式(II)、

## 【0020】

## 【化5】



## 【0021】

(式中、X及びYはそれぞれ独立して-CH=又は-N=を示す。)

で表される化合物やこれらの1:1混合物が挙げられる。

以下の説明のためにこれらの化合物又はこれらの混合物に次のように番号を付ける。

XがCHで、YがCHの場合の化合物を、化合物1とし、

XがCHで、YがNの場合の化合物を、化合物2とし、

XがNで、YがCHの場合の化合物を、化合物3とし、

XがNで、YがNの場合の化合物を、化合物4とし、

化合物1と化合物2の1:1の混合物を、化合物5とし、

化合物1と化合物3の1:1の混合物を、化合物6とし、

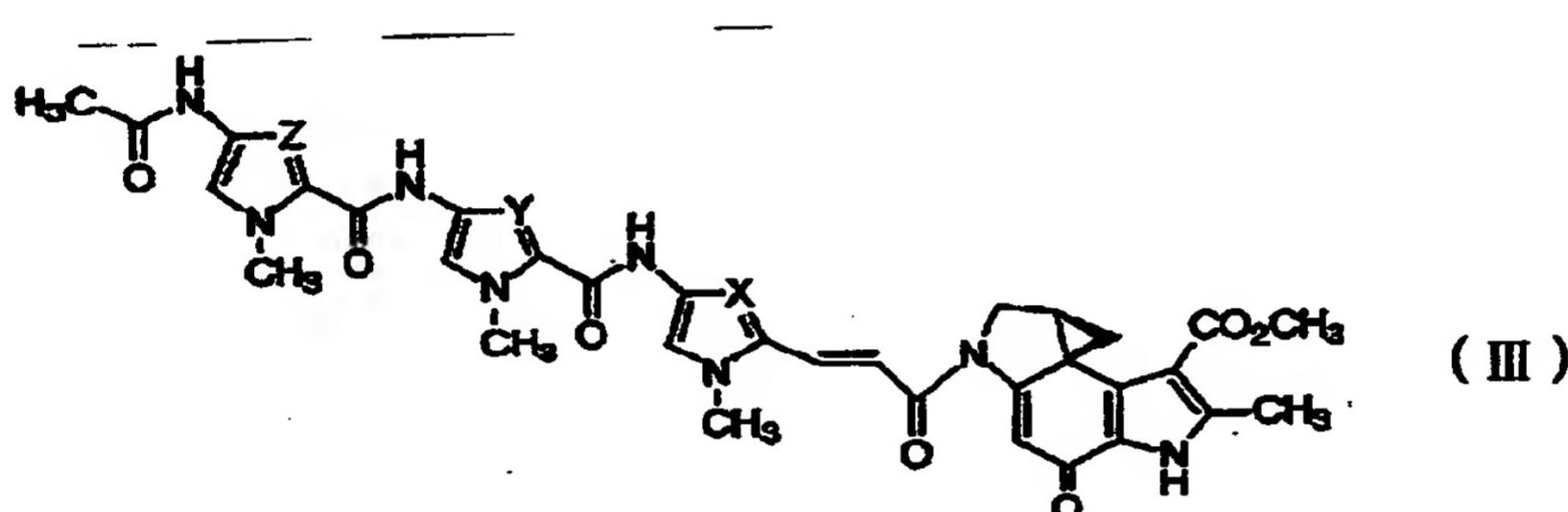
化合物1と化合物4の1:1の混合物を、化合物7とし、

化合物2と化合物3の1:1の混合物を、化合物8とし、  
 化合物2と化合物4の1:1の混合物を、化合物9とし、  
 化合物3と化合物4の1:1の混合物を、化合物10とする。

また、次式のPyPyPyLDu86を基本構造とする{Py又はIm} {Py又はIm} {Py又はIm} LDu86の構造を有する一般式(III)、

【0022】

【化6】



【0023】

(式中、X、Y及びZはそれぞれ独立して-CH=又は-N=を示す。)  
 で表される化合物やこれらの1:1混合物が挙げられる。

以下の説明のためにこれらの化合物又はこれらの混合物に次のように番号を付ける。

XがCHで、YがNで、ZがNの場合の化合物を、化合物11とし、  
 XがCHで、YがNで、ZがCHの場合の化合物を、化合物12とし、  
 XがCHで、YがCHで、ZがCHの場合の化合物を、化合物13とし、  
 化合物11と化合物12の1:1の混合物を、化合物14とし、  
 化合物11と化合物13の1:1の混合物を、化合物15とし、  
 化合物12と化合物13の1:1の混合物を、化合物16とする。  
 これらの化合物1~16について後述する試験を行った。

【0024】

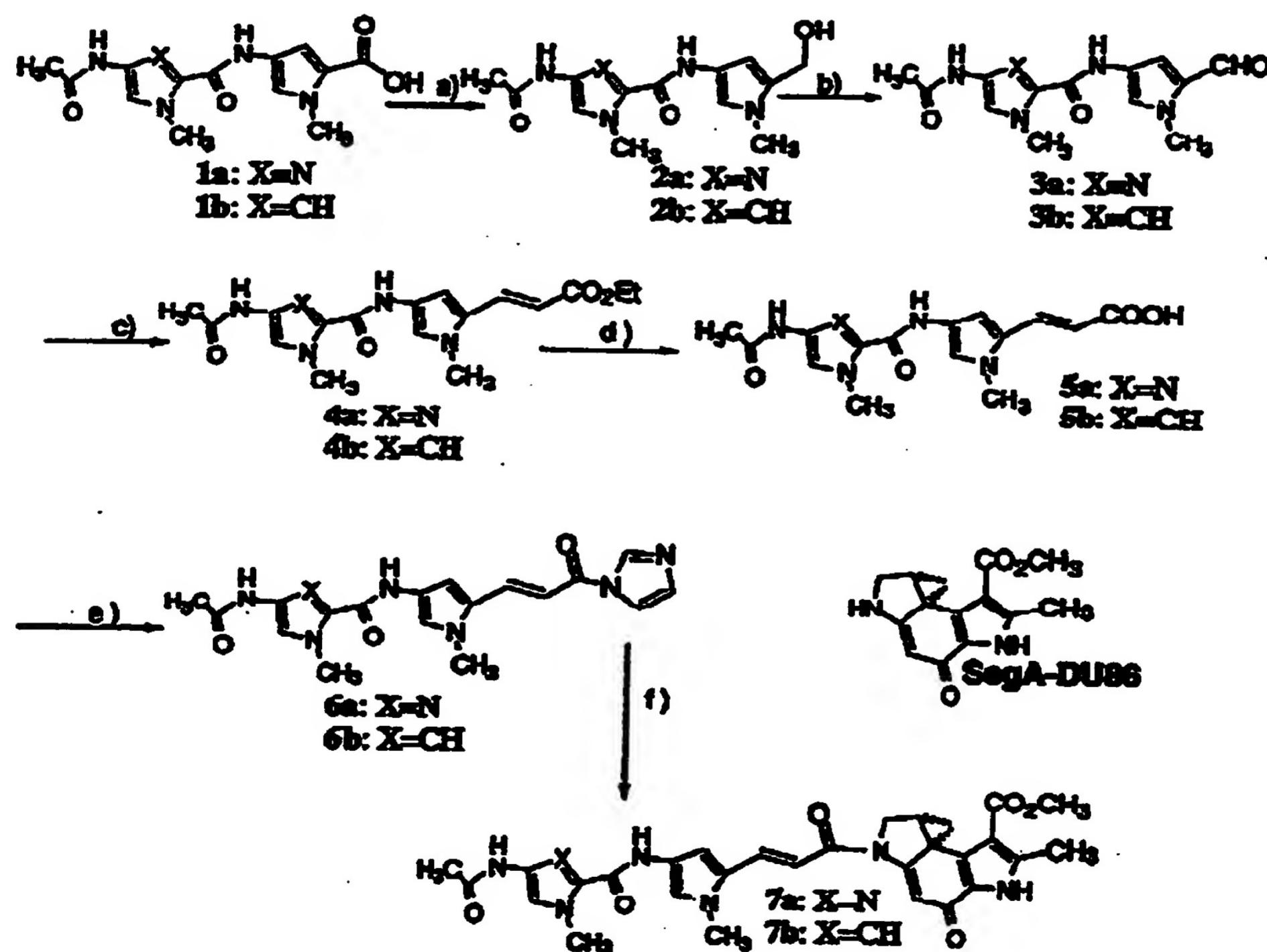
本発明の一般式(I)で表される化合物は、公知の方法に準じて製造することができる。即ち、Aセグメント及びBセグメントを常法により製造し、これに順次リンカーセグメントLを結合させ、次いで残りのセグメントを結合させることにより製造することができる。

## 【0025】

例えば、前記のImPyLDu86(7a)及びPyPyLDu86(7b)の製造例を次の化学反応式で示す。反応式中の各化合物の下の数字は化合物の番号を示す。

## 【0026】

## 【化7】



## 【0027】

反応式中のa)はベンゾトリアゾールー1-イルオキシトリス(ジメチルアミ

ノ) ホスホニウム ヘキサフルオロホスフェート (BOP) の THF 溶液での処理、次いで  $\text{NaBH}_4$  処理を示し、b) は THF 中での  $\text{MnO}_2$  処理を示し、c) は THF 中でのトリエチルホスホノアセテート及び  $\text{NaH}$  処理を示し、d) は水-メタノール中での水酸化ナトリウムによる処理を示し、e) は DMF 中での 1, 1-カルボニルジイミダゾールでの処理を示し、f) は DMF 中での水素化ナトリウムを用いた DU86 のセグメント A との処理を示す。

#### 【0028】

こうして合成された PyPyLDu86 および、ImPyLDu86 の DNA との反応性を調べた。ImPyLDu86 によるアルキル化の結果を図 1 に示した。この実験に用いた DNA 及び使用した ImPyLDu86 を図 2 に示す。

#### 【0029】

右側の泳動図は 2 本鎖 DNA の上のストランドの結果、中央の泳動図は下のストランドの結果である。アルキル化の位置は加熱により切断バンドとしてみることができる。その結果低濃度から主に 2 本鎖 DNA はサイト 1 とサイト 2 で 2 本鎖の切断されていることがわかり、アルキル化が 2 本鎖で同時に起っていることが判断できる。このような切断を引き起こす化合物はこれまでに例がなく、まさに人工の制限酵素ということができる。また用いた ImPyLDu86 の量から 70% の高率で切断が起っていることが判明し、以前に合成した分子（特願平10-260710号参照）にくらべて非常に高い効率であることがわかる。

#### 【0030】

DNA 又は RNA を含有する物質としては、DNA や RNA それ自体を使用することもできるが、生きている細胞を使用するのが好ましい。セグメント A として抗癌剤を用いる場合には癌細胞を使用することができる。

一般式 (I) におけるセグメント B において、非天然型の塩基としてメチルピロール (Py) 及びメチルイミダゾール (Im) を使用する場合には、Py-Im により C-G 塩基対が、Im-Py により G-C 塩基対が、Py-Py により A-T または T-A 塩基対が認識されているから、メチルピロール (Py) 及びメチルイミダゾール (Im) を適宜組み合わせることにより、目的の塩基配列を認識させることができる。即ち、メチルピロール (Py) 及びメ

チルイミダゾール（I m）を、3個（3量体）用いることにより天然の3塩基の配列を認識することができ、4個（4量体）用いることにより天然の4塩基の配列を認識することができる。

また、これらのセグメントBの配列有する化合物の2種以上混合して使用することもできる。

### 【0031】

本発明の方法は、一般式（I）で表される化合物とDNA又はRNAを含有する物質とを充分に作用させた後、DNA又はRNAを含有する物質の状態を測定することにより、DNA又はRNAを含有する物質に対する化学種Aの作用を検出または同定することができる。

一般式（I）で表される化合物とDNA又はRNAを含有する物質とを充分に作用させる手段としては、両者を適当な緩衝液中でインキュベーションするなどの方法によりおこなうことができる。また、インキュベーションの後の、DNA又はRNAを含有する物質の状態を測定する手段としては、各種の標識化や着色法などの手段により行うことができる。インキュベーションの後の、DNA又はRNAを含有する物質の状態に応じて適宜その手段を選択することができる。

DNA又はRNAを含有する物質として生きている細胞を用い、その生死によって判定する場合には、細胞を着色する方法が簡便で好ましい。市販のセルカウンティングキットを、又はこれと着色における吸光度とを併用することにより生存細胞を定量化することもできる。

### 【0032】

つぎに本発明の具体的な使用例について説明する。

図3は本発明の方法を例示したものである。図3の左側に升目のように示されているのは、複数のウェルを有するプレートであり、各升目が各ウェルを示している。この例では96穴のプレートが示されている。この各ウェルに本発明の前記一般式（I）で表される化学種を存在させておく。各ウェルに異なる塩基配列を認識する本発明の一般式（I）で表される化学種を存在させておく場合についてまず説明する。

例えば、4量体では、一般式（I）で表される化学種のセグメントBの部分に

、メチルピロール（Py）及びメチルイミダゾール（Im）からなる非天然型の塩基を用いて、Py-Py-Py-Py、Py-Py-Py-Im、Py-Py-Im-Py、Im-Im-Im-PyなどのPyとImからなるすべての順列組み合わせの構造（この例では16通りになる）を用いて異なる3塩基を認識し得るものができる。一般式（I）のセグメントAの部分にアルキル化剤を結合させて、ビニル基を含むリンカーLで結合させる。

## 【0033】

そして、このセグメントBの部分が異なる16種類の化学種を図3の左側にしめされるプレートの各ウェルに入れる。次いで、各ウェルに癌細胞を入れ、数時間～数日間これをインキュベートさせると、癌細胞の特定の塩基配列部分を認識した本発明の一般式（I）で表される化学種は癌細胞のDNAと反応してこれをアルキル化して癌細胞を殺すことになる。その結果を示したのが図3の右側である。図3の右側は、前記のインキュベートが終了した後、各ウェルを着色し、細胞が生きている場合は着色剤により着色されて図3では黒く示されているが、細胞が死んで着色剤により着色されない無い場合には図3では白く示されている。図3の例ではセグメントBとして8量体を使用した例であり、3種の非天然型の塩基の配列において癌細胞が死滅したことが示されている。各ウェルに存在させた非天然型の塩基の配列は予め判っているから、この試験によりどの配列の場合に癌細胞が死滅したかを知ることができる。

## 【0034】

図3の例では、8量体が使用されており、2の8乗、即ち256通りのセグメントB部分を有する一般式（I）で表される化学種が各ウェルに存在させられており、この例ではこのうち3種類の配列のものが特異的に癌細胞を死滅させていことがある。この3種の配列はこの例では、

Py Im Py Py Py Im Py Py、

Py Im Py Py Py Im Im Py、及び、

Im Im Py Py Py Im Py Py、

であることがわかる。

## 【0035】

癌細胞は、その種類や生物に応じて異なっており、本発明の前記に示した方法によれば、測定された検体としての癌細胞に特異的に作用する抗癌剤を、短時間で、簡便に検索することができる。また、癌細胞は同じ組織の癌細胞であっても時期に応じて変異する場合があり、このような場合においても変異した癌細胞に特異的な抗癌剤を本発明の方法により簡便に検索することができる。さらに、本発明の前記方法によれば、癌組織の周囲の正常細胞に対する抗癌剤の作用をも同様な方法で調べることができる。

したがって、本発明の方法は、正常細胞には影響を与えず、目的の癌細胞に特異的に作用する抗癌剤を短時間で、簡便に検索することができる方法を提供するものである。

#### 【0036】

次に前記した化合物1～16についてその活性を評価した。

ピロール(Py)、イミダゾール(Im)アミド部が合計2つ或いは3つで構成されている化合物群を用いて細胞毒性試験を行った。前記の化合物1～16の16種類を用い、その効果を細胞の生存率で示した結果を図4に示す。ヒト癌細胞LCL-wt、HLC-2、ヒト白血病細胞Jurkat、を用いて一斉スクリーニングを行った場合、LCL-wtに対してのみ化合物14が高い細胞毒性を示し、JurkatとHLC-2に対しては有用な結果が示されなかった。

図4は、100nMの濃度におけるLCL-wtとJurkatに対する化合物群1～16の細胞毒性の試験結果を示したものである。

#### 【0037】

このように、本発明の一般式(I)で示される化合物の2種以上の混合物も特異的な活性を示すことが明らかになり、このような混合物に対する試験方法の例を図5に示す。図5は8×8の64ウェルのものである。

セグメントBの部分が3個の認識部位になる場合を例示しており、認識コンポーネントとしてピロール系(Py)とイミダゾール系(Im)を用いた場合には2の3乗種類、即ち8種類の組み合わせが考えられる。この8種を縦横各々25μlづつ各ウェルに入れる。例えば、プレートの1行目と1列目に各々25μlのPy-Py-Pyを入れ、次いでプレートの2行目と2列目に各々25μlの

$P_y - I_m - P_y$ を入れ、さらにプレートの3行目と3列目に各々 $25\mu l$ の $P_y - P_y - I_m$ を入れというように、8種の化合物を各々の行及び列に入れてゆくことにより、プレートの対角線の部分のウェルは1種類の化合物のみとなるが、対角線の部分以外のウェルには各々異なる2種類の化合物からなる1:1の混合物が入れられたことになる。そして、図3に示した方法と同様にして癌細胞とインキュベーションした後、これを着色処理した結果が図5に例示されている。

### 【0038】

図5の例では、3行3列目、2行6列目及び6行2列目、並びに4行8列目及び8行4列目で癌細胞の死滅が観察されている。これは、この癌細胞に対しては3行3列目これは対角線の部分のウェルであるから、即ち $P_y - P_y - I_m$ の配单独で癌細胞を死滅させていることがわかり、2行6列目及び6行2列目、並びに4行8列目及び8行4列目は各々対角線に対して対象の位置であり、前者では $P_y - I_m - P_y$ と $I_m - P_y - I_m$ の1:1混合物であり、後者は $P_y - I_m - P_y$ と $I_m - I_m - I_m$ との1:1混合物である。そしてこの例ではこの癌細胞に対してはこれらのセグメントBを有する化合物又は混合物が特異的に有効であることが示されている。

さらに、この例において重要なことは、一般式(I)の化合物の癌細胞に対する有効性がこの化合物を単独で使用する場合には示されないが、他の化合物と混合して使用した場合に初めてその有効性が示される場合があることを明らかにしているということである。

このような本発明の試験方法により、一般式(I)で表される化合物を単独で用いた場合の結果を得ると同時に、これらの化合物を混合して使用した場合の結果をも得ることができる。

### 【0039】

以上の例は、癌細胞に特異的な抗癌剤を検索する方法であるが、特定の塩基配列の位置において有効性が知られている癌細胞をDNA又はRNAを含有する物質として使用し、当該塩基配列に対応した本発明の一般式(I)のセグメントBの部分を有する化学種を調製し、そのセグメントAの部分に各種の抗癌剤の候補化合物を結合させた、セグメントAの部分が異なる複数種の本発明の一般式(I)

) で表される化学種を各ウェルに存在させ、これを前記の癌細胞とインキュベートさせることにより、セグメントAの部分の抗癌剤の候補化合物の作用を検索することができる。

即ち、本発明のひとつの実施形態としては、本発明の一般式（I）のセグメントAの部分に抗癌剤の候補化合物を結合させることにより、癌細胞に対する抗癌作用をスクリーニングする方法を提供するものである。

#### 【0040】

また、本発明は、前記してきた各種の本発明の方法を行うための、DNA又はRNAを含有する物質に対する化学種Aの作用を検出または同定用のキットを提供するものである。

より詳細には、一般式（I）



(式中、BはDNAの塩基配列を認識することができる非天然型の塩基を含有する化学構造を示し、AはDNAとの相互作用を有する化学構造を示し、LはA及びBの化学構造を結合させ得るリンカーを示す。)

で表されるDNAの塩基配列を認識し得る化学種、及び作用後のDNA又はRNAを含有する物質の状態を測定する手段のための器具又は試薬からなるDNA又はRNAを含有する物質に対する化学種Aの作用を検出または同定用のキットを提供する。前述したように、本発明の一般式（I）の化合物はこれを単独で使用してもよいが、この2種以上を混合して使用できるようにしておいてもよい。

#### 【0041】

さらに、本発明は、複数のウェルを有するプレート中の各ウェルに、一般式（I）、



(式中、BはDNAの塩基配列を認識することができる非天然型の塩基を含有する化学構造を示し、AはDNAとの相互作用を有する化学構造を示し、LはA及びBの化学構造を結合させ得るリンカーを示す。)

で表されるDNAの塩基配列を認識し得る化学種が存在してなる複数のウェルを有するプレートを提供するものである。より詳細には、本発明のプレートは、D

N A又はRNAを含有する物質に対する化学種Aの作用を検出または同定するためのプレートである。

前記の一般式(I)で表される化合物は、この1種又は2種以上をプレートの各ウェルに固定化しておくこともできる。また、溶液又はゲル状にしておくこともできる。

## 【0042】

## 【実施例】

次に、具体的な試験例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの具体例に限定されるものではない。

## 【0043】

## 実施例1（細胞毒性試験による制癌効果の評価）

腫瘍細胞として、ヒト癌細胞LCL-wtとHLC-2、ヒト白血病細胞、Jurkat、ヒト子宮けい癌細胞HeLa cellを用いた。LCL-wtとJurkatに対してはPRMI 1640 (Gibco BRL) + 10%牛胎児血清 (JRH BIO SCIENCES) + 100 μU/mlペニシリンG-100 μU/mlストレプトマイシン硫酸塩 (Gibco BRL) を培養培地として用いた。HLC-2に対してはMEM+10%牛胎児血清 (JRH BIO SCIENCES) + 100 μU/mlペニシリンG-100 μU/mlストレプトマイシン硫酸塩 (Gibco BRL) を培養培地として用いた。ヘラ細胞 (HeLa cell) に対してはRBMI+10%牛胎児血清 (JRH BIO SCIENCES) + 100 μU/mlペニシリンG-100 μU/mlストレプトマイシン硫酸塩 (Gibco BRL) を培養培地として用いた。それぞれ細胞は培養し対数増殖期にあるものを分散してスクリーニングに用いた。

スクリーニングは、初期細胞数を約 $2 \times 10^5$  cells/mlに調整した細胞懸濁液を96ウェルのマルチプレートに50 μl/ウェル分注し、試験化合物の試験溶液 (100 μM、培地+0.1%DMSO) を添加し、37°C、CO<sub>2</sub>濃度5%の条件下、インキュベーターで2日間前培養を行い、その後細胞数をカウントした。

細胞数は、マイクロプレートリーダー (Micro Plate Reader) (MPR-A4

i、TOSOH)と血球計算板を用いて計算した。マイクロプレートリーダーを用いた測定においては、セルカウティングキット8 (Cell Counting Kit-8) (DOJINDO)を用い、測定波長450 nm (参照波長600 nm)で吸光度を測定した。生細胞数、死細胞数のカウントはトリパンブルーを用いた色素排除法により顕微鏡下で行った。マイクロプレートリーダーと血球計算板での測定結果を元に生存率を以下の式により算出した。

$$\text{生存率} = 100 n_p / n_a$$

ここで、 $n_p$  は試料を添加した場合の生細胞数、 $n_a$  はコントロール生細胞数である。

#### 【0044】

##### 実施例2 (細胞毒性試験)

本文中に記載した化合物1～16を用いて、本発明のプレートによりヒト癌細胞LCL-wt、HLC-2、ヒト白血病細胞Jurkat、を用いて一斉スクリーニングを行った。

その結果を実施例1と同様に行って、各細胞の生存率を計算した。

結果を図4に示す。図4は試験化合物の濃度が100 nMの場合の結果を示す。

この結果によれば、LCL-wtに対してのみ化合物14が高い細胞毒性を示すことがわかった。

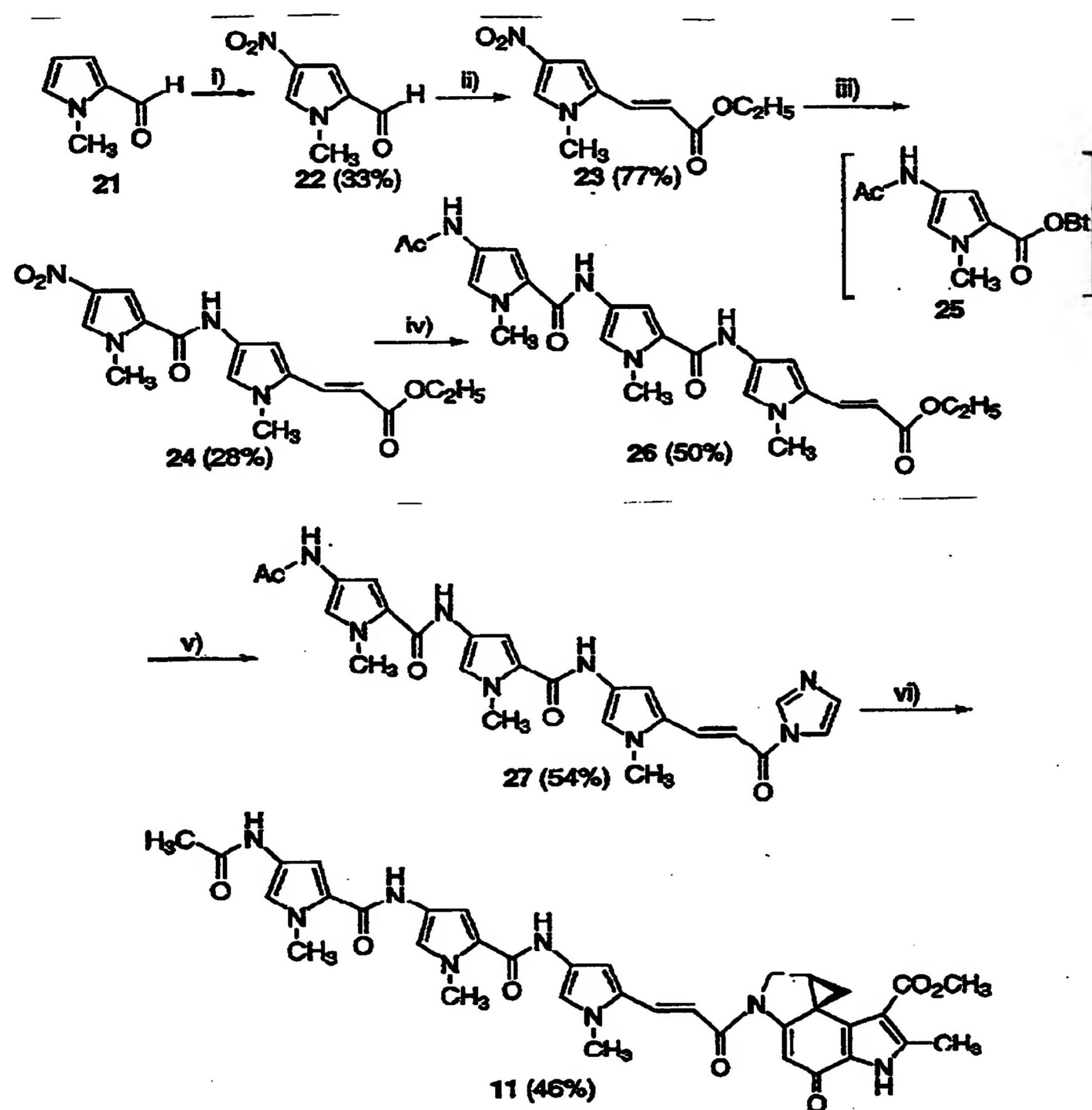
#### 【0045】

##### 実施例3 (化合物の合成)

化合物13の合成方法を次に示した。

#### 【0046】

【化 8】



【0047】

反応及び精製に用いた試薬、溶媒は市販のものを用いた。プロトン核磁気共鳴スペクトル (NMR) は日本電子 JNM-A500 を使用し、テトラメチルシリジン (TMS) を内部標準物質として化学シフトは  $\delta$  値 (ppm) で示した。シグナルの略号として、s (singlet)、d (doublet)、t (triplet)、q (quarter)、m (multiplet)、br (broad)、br s (broad singlet) を用いた。試薬、溶媒の略号

は以下のように用いた。ジメチルホルムアミド(DMF)、ジシクロヘキシリカルボジイミド(DCC)、カルボニルジイミダゾールe(CDI)、4-(ジメチル)アミノピリジン(DMAP)、N-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBt)、1-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]-3-エチルカルボジイミド塩酸塩(EDCI)、テトラヒドロフラン(THF)。反応は特に示さない限り、アルゴン雰囲気下或いは窒素雰囲気下で行った。

## 【0048】

## (1) 1-メチル-4-ニトロピロール-2-アルデヒド(22)

発煙硝酸(1.5ml、37.5mmol)の無水酢酸(25ml)溶液を-30℃に冷却し、同温下1-メチルピロール-2-カルボキシアルデヒド21(3.27g、30.0mmol)の無水酢酸(10ml)溶液を滴下し、同温で5時間攪拌した。その後析出した固体をろ取し、ニトロ体22(860mg、19%)を得た。ろ液の溶媒を減圧下留去し、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサン-酢酸エチル(4:1、v/v)溶出部より更に22(650mg、14%)を得た。

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ : 4.00(3H,s), 7.40(1H,d, J=2.0Hz),  
7.65(1H,d, J=2.0Hz), 9.61(1H,s) ;

IR (KBr) ν : 1678, 1535, 1508, 1423, 1406,  
1311, 1100, 864, 814, 770, 754 cm<sup>-1</sup>

## 【0049】

(2) Py-L-CO<sub>2</sub>Et(23)

ホスホノ酢酸トリエチル(0.39ml、2.0mmol)のTHF(15ml)溶液に冰冷下60%水素化ナトリウム(83mg、2.1mmol)を加え10分間攪拌した。同温下ニトロ体22(200mg、1.3mmol)のTHF(5ml)溶液を滴下し、さらに45分同温で攪拌した。反応溶液中に水をえた後、酢酸エチルで抽出した。有機相を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を減圧下留去し、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサン-酢酸エチル(1:4、v/v)溶出部よりエステル23(225mg、77%)を得た。

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ : 1.28(3H, t, J=7.5Hz), 3.75(3H, s),  
4.24(2H, q, J=7.5Hz), 6.28(1H, d, J=16.0Hz), 7.09(1H, d, J=2.0Hz),  
7.47(1H, d, J=16.0Hz), 7.54(1H, d, J=2.0Hz) ;

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ : 14.3, 35.4, 60.8, 106

1, 118.4, 125.3, 129.8, 130.1,  
136.7, 166.5;

IR (KBr) ν : 1709, 1632, 1510, 1427, 1412,  
1373, 1315, 1282, 1176 cm<sup>-1</sup>

#### 【0050】

(3) Py-Py-L-CO<sub>2</sub>Et (24)

エステル23 (1.12g, 5.0mmol) のメタノール溶液 (45ml) に室温下 10% パラジウム炭素 (250mg) を加えた。この混合物に 1N 水素化ホウ素ナトリウム (8ml) を同温下加え、さらに 10 分攪拌した。アセトン (2ml) を加えた後、この懸濁液をセライトに通して沈殿物を除去した。ろ液の溶媒を減圧下留去し、得られた残留物に酢酸エチルを加えた。飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を減圧下留去し、得られた残留物を塩化メチレン (45ml) に溶解しさらなる反応に用いた。この溶液に 1-メチル-4-ニトロ-2-トリクロロアセチルピロール (2.35g, 7.0mmol) と N, N-ジイソプロピルエチルアミン (1.31ml, 7.5mmol) を順次室温で加え、同温下 3 時間攪拌した。その後、反応溶液中に水を加えた後、酢酸エチルで抽出した。有機相を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を減圧下留去し、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、酢酸エチル溶出部よりビスピロール24 (483mg, 28%)を得た。

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub> + DMSO-d<sub>6</sub>) δ : 1.23(3H, t, J=7.0Hz),  
3.59(3H, s), 3.94(3H, s), 4.14(2H, q, J=7.0Hz), 6.01(1H, d, J=15.5Hz),  
6.57(1H, d, J=2.0Hz), 7.27(1H, br s), 7.45(1H, d, J=15.5Hz),  
7.46(1H, d, J=1.5Hz), 7.50(1H, d, J=2.0Hz), 9.59(1H, br s)

## 【0051】

(4) Py-Py-Py-L-CO<sub>2</sub>Et (26)

ビスピロール24 (173mg、0.50mmol) のメタノール-酢酸エチル (10ml-10ml) の懸濁液に室温下10%パラジウム炭素 (50mg) を加えた。この混合物に1N水素化ホウ素ナトリウム (1.5ml) を同温下加え、さらに2分攪拌した。この懸濁液をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに通して沈殿物を除去した。溶媒を減圧下留去し、得られた残留物をDMF (10ml) に溶解しさらなる反応に用いた。この溶液に4-アセトアミノ-1-メチルピロール-2-カルボン酸のHOBtエステル25 (Z.-F.Tao, et al., J.Am.Chem.Soc., 121, 4961-4967 (1999)) (209mg、0.70mmol) とD MAP (85mg、0.70mmol) を順次室温で加え、同温下3時間攪拌した。その後、溶媒を減圧下留去し、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付した。メタノール-酢酸エチル (1:9、v/v) 溶出部よりトリスピロール26 (120mg、50%)を得た。

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ : 1.29(3H, t, J=7.0Hz), 2.06(3H, s), 3.59(3H, s), 3.81(3H, s), 3.84(3H, s), 4.20(2H, q, J=7.0Hz), 5.99(1H, d, J=15.5Hz), 6.51(1H, s), 6.58(1H, s), 6.61(1H, s), 6.94(1H, d, J=2.0Hz), 7.13(1H, s), 7.32(1H, d, J=2.0Hz), 7.47(1H, d, J=15.5Hz), 7.78(1H, s), 7.98(1H, s), 8.36(1H, s)

## 【0052】

(5) Py-Py-Py-L-CO<sub>2</sub>Im (27)

トリスピロール26 (24mg、0.050mmol) のメタノール-THF (10ml-10ml) の溶液に室温下1N水酸化ナトリウム水溶液 (1.5) を加え室温で5時間攪拌した。溶媒を減圧下留去し、得られた残留物に10%酢酸水溶液を加え、生じた沈殿物をろ取し、加水分解体 (13.5mg)を得た。この加水分解体はさらなる精製を行わずに次の反応に用いた。加水分解体 (12.8mg) のDMF (1.5ml) 溶液にCDI (24.3mg、0.15mmol) を室温で加え、同温下一晩攪拌した。その後水を加え、生じた沈殿をろ取してイミダゾールエステル27 (13.5mg、54%)を得た。

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ : 1.96(3H, s), 3.77(3H, s), 3.82(3H, s),  
 3.85(3H, s), 6.85(1H, s), 7.08(1H, s), 7.09(1H, s),  
 7.12(1H, d, J=15.0Hz), 7.14(1H, s), 7.22(1H, s), 7.24(1H, s),  
 7.47(1H, s), 7.87(1H, d, J=15.0Hz), 7.90(1H, s), 8.66(1H, s),  
 9.80(1H, s), 9.89(1H, s), 10.03(1H, s)

## 【0053】

## (6) Py-Py-Py-L-DU86 (11)

DU86のA部28 (S.Nagamura, et al., J.Med.Chem., 40, 972-979 (1999)) (6.2mg、0.024mmol) のDMF (2ml) 溶液に氷冷下60%水素化ナトリウム (2.0mg、0.050mmol) を加え、同温で10分攪拌した。その後、同温下イミダゾールエステル27 (12.9mg、0.026mmol) のDMF (1ml) 溶液を加え、同温でさらに5時間攪拌した。リン酸ナトリウムバッファー (pH 6.86) を加えた後、水を加え、塩化メチレンで抽出した。その後、溶媒を減圧下留去し、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付した。メタノール-クロロホルム (1:9, v/v) 溶出部よりPy-Py-Py-L-DU86 11 (7.7mg、46%)を得た。

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ : 1.29-1.31(1H, m), 1.97(3H, s),  
 2.07-2.11(1H, m), 2.47(3H, s), 3.72(3H, s), 3.78(3H, s), 3.82(3H, s),  
 3.83(3H, s), 4.17-4.22(1H, m), 4.27-4.32(1H, m),  
 6.57(1H, d, J=15.0Hz), 6.83-6.85(br s), 6.86(1H, s), 6.90(1H, s),  
 7.06(1H, s), 7.15(1H, s), 7.24(1H, s), 7.39(1H, s),  
 7.57(1H, d, J=15.0Hz), 9.80(1H, s), 9.89(1H, s), 9.94(1H, s),  
 12.36(1H, s)

## 【0054】

## 【発明の効果】

本発明は、簡便な方法により特定の細胞に対して特異的に作用する物質を短時間でかつ高感度で、しかも安価な手段によりスクリーニングできる方法及びそのためのキット及びプレートを提供するものである。本発明の方法によれば、患者

の細胞、例えば癌細胞に特異的に作用する薬物を短時間で簡便に知ることができ、患者の癌細胞に応じたティラーメイドの治療薬を創出することができ、患者に対してより副作用が少なく、かつ効力の大きな治療薬を提供することができる。

また、本発明の方法によれば、DNAやRNAに作用する物質を簡便に、高濃度でかつ安価にスクリーニングすることができる。また、DNAやRNAに対する作用が既知の物質におけるDNAやRNAにおける作用部位を本発明の方法により簡便に知ることも可能となる。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】

図1は、本発明のImPyLDu86とDNAとの反応の結果を示した、図面に代わる写真である。

##### 【図2】

図2は、図1の実験に使用したDNAの塩基配列及びImPyLDu86の化学構造を示したものである。

##### 【図3】

図3は、本発明のプレートを用いた癌細胞に特異的な抗癌剤をスクリーニングする方法を例示したものである。

##### 【図4】

図4は、本発明の化合物1～16の100nMの濃度における癌細胞の生存率を示したものである。

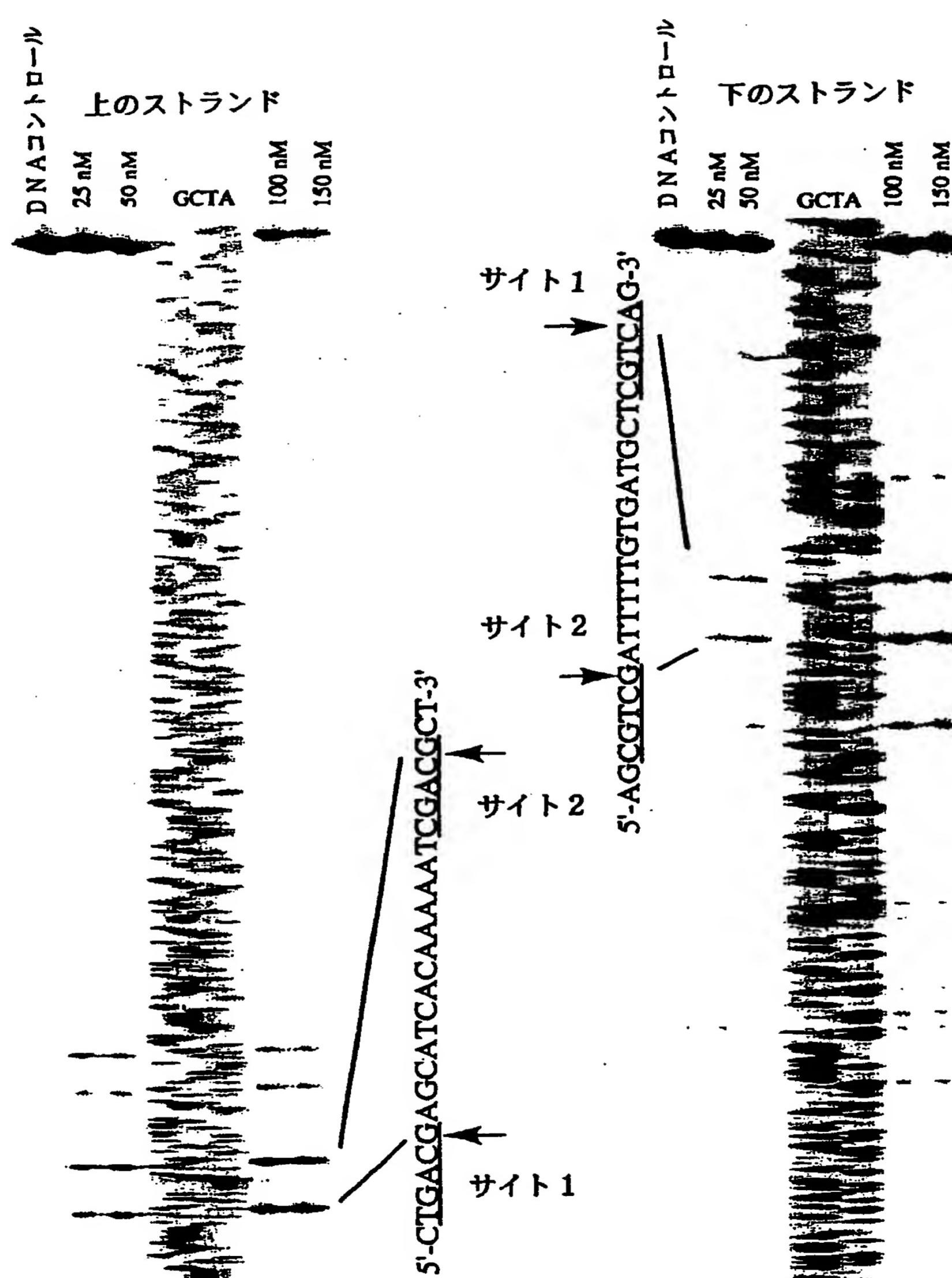
##### 【図5】

図5は、本発明のプレートを用いて、本発明の化合物を単独で使用した場合とこれらを混合して使用した場合を同時に試験する方法を例示したものである。

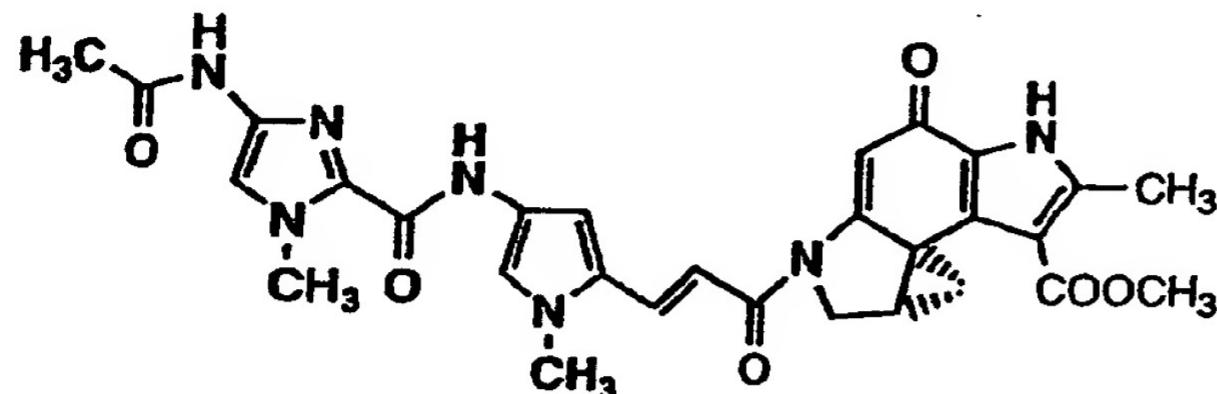
【書類名】

四面

### 【図1】



【図2】



5'- AGAACAGGG GATAACGCAG GAAAGAACAT GTGAGCAAAA GGCCAGCAAA  
3'- TCTTAGTCCC CTATTGCGTC CTTTCTTGTA CACTCGTTTT CGGGTCGTTT

AGGCCAGGAA CCGTAAAAAG GCCGCGTTGC TGGCGTTTTT CCATAGGCTC  
TCCGGTCCTT GGCATTTTC CGGCGAACG ACCGCAAAAAA GGTATCCGAG

Site 1 ↓ Site 2 ↓  
CGCCCCCTG ACGAGCATCA CAAAATCGA CGCTCAAGTC AGAGGTGGCG  
GCGGGGGGAC TGCTCGTAGT GTTTTAGCT CGGAGTTCAAG TCTCCACCGC

↑ ↑  
AAACCCGACA GGACTATAAA GATACCAGGC GTTTCCCCCT GGAAGCTCCC  
TTTGGGCTGT CCTGATATTT CTATGGTCCG CAAAGGGGA CCTTCGAGGG

TCGTGCGCTC TCCTGTTCCG ACCCTGCCGC TTACCGGATA CCTGTCCGCC  
AGCACCGCAG AGGACAAGGC TGGGACGGCG AATGGCCTAT GGACAGGGCG

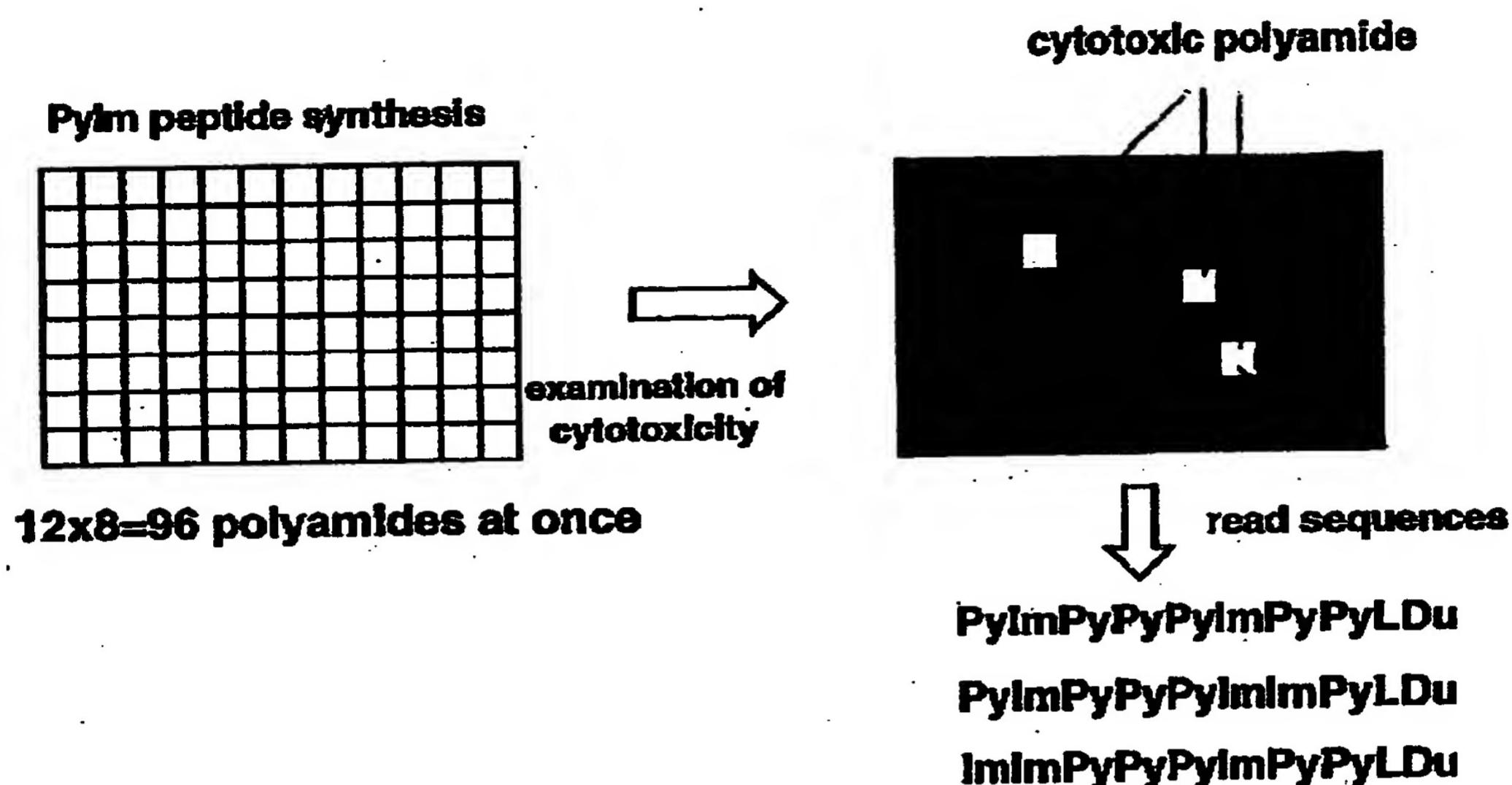
TTTCTCCCTT CGGGAAAGGT GGCGCTTCT CAATGCTCAC GCTGTAGGTA  
AAAGAGGGAA GCCCTTAGCA CCGCGAAAGA GTTACGAGTG CGACATCCAT

TCTCAGTTCG GTGTAGGTCTG TTCGCTCAA GCTGGGCTGT GTGCACGAAC  
AGACTCAAGC CACATCCAGC AAGCGAGGTT CGACCCGACA CACGTGCTTG

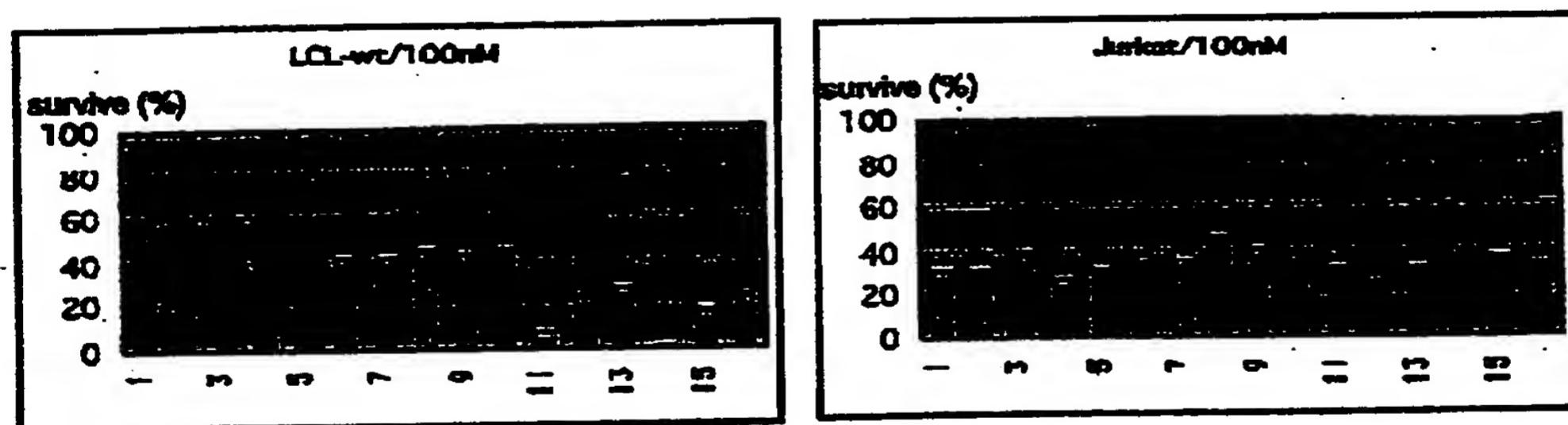
CCCCCGTTCA GCCCGACCGC TGGCCTTAT CCGGTAACCA TCGTCTTGAG  
GGGGGCAAGT CGGGCTGGCG ACAGCGGAATA GGCCATTGAT AGCAGAACTC

TCCAACCCGG TAAGACACGA CTTATGCCA CTGGCAGCGAG CCACGGTAA-3'  
AGGTTGGGCC ATTCTGTGCT GAATAGGGT GACCGTCGTC GGTGACCATT-5'

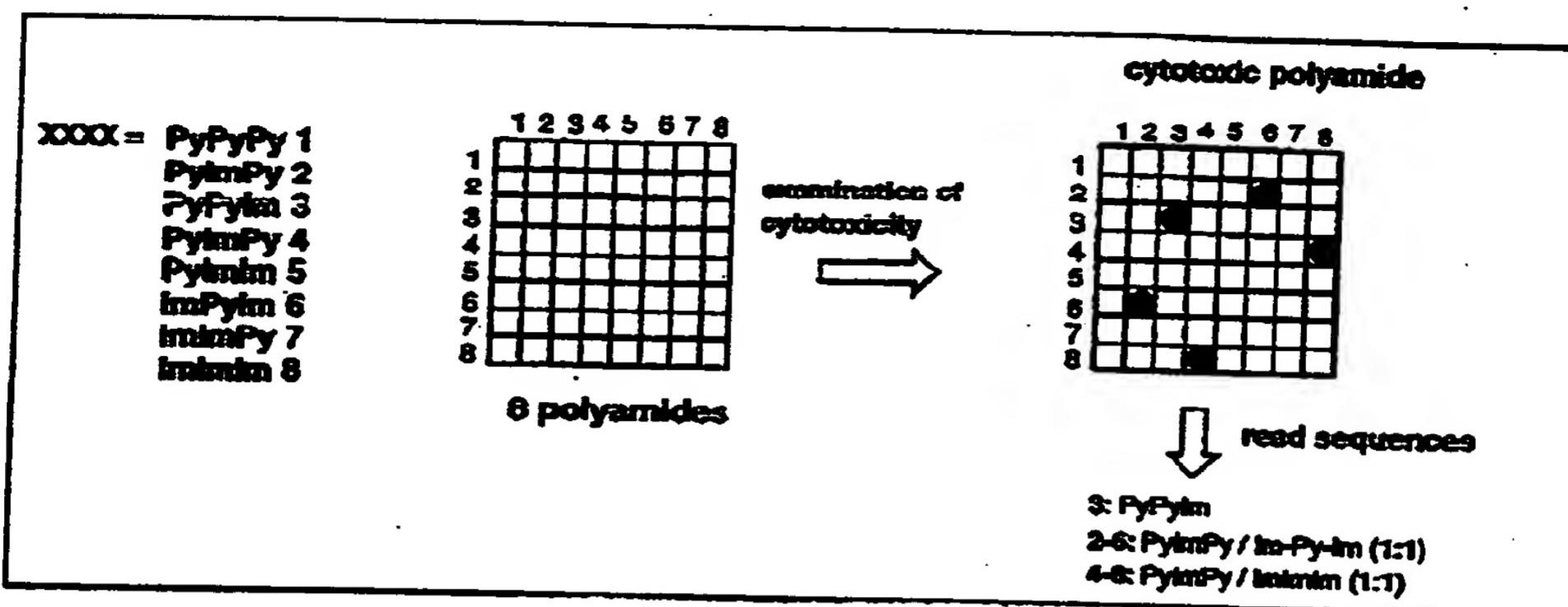
【図3】



【図4】



【図5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、これらの人工の化学種を用いて細胞などのDNA又はRNAを含有する物質に対するセグメントA（化学種A）の作用をスクリーニングする方法を提供するものである。

【解決手段】 本発明は、一般式（I）



（式中、BはDNAの塩基配列を認識することができる非天然型の塩基を含むする化学構造を示し、AはDNAとの相互作用を有する化学構造を示し、LはA及びBの化学構造を結合させ得るリンカーを示す。）

で表されるDNAの塩基配列を認識し得る化学種の1種又は2種以上を用いて、DNA又はRNAを含有する物質に対する化学種Aの作用を検出または同定する方法、そのためのキット、及びそれに用いるプレートに関する。

【選択図】 なし

【書類名】 手続補正書  
【整理番号】 PA902087  
【提出日】 平成11年12月17日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【事件の表示】  
    【出願番号】 平成11年特許願第326007号  
【補正をする者】  
    【識別番号】 396020800  
    【氏名又は名称】 科学技術振興事業団  
    【代表者】 理事長 中村 守孝  
【代理人】  
    【識別番号】 100102668  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 佐伯 憲生  
    【電話番号】 03-5205-2521  
【手続補正 1】  
    【補正対象書類名】 明細書  
    【補正対象項目名】 発明の名称  
    【補正方法】 変更  
    【補正の内容】 1  
【プルーフの要否】 要

特平11-32600

【発明の名称】 生理活性ピロールイミダゾール誘導体のスクリーニング方法

出願人履歴情報

識別番号 [396020800]

1. 変更年月日 1998年 2月24日

[変更理由] 名称変更

住 所 埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名 科学技術振興事業団

